

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001562

抑制 C5L2 表达对 Th17 细胞功能和 小鼠肾移植急性排斥反应的作用

程洪林¹,何云锋²,张尧²,王德林²,蒲军²,吴小侯²

(1. 重庆市长寿区人民医院泌尿外科,重庆长寿 401220;2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨补体 C5a 关键受体 C5L2 表达抑制后,对小鼠肾移植急性排斥反应模型中 Th17 细胞功能以及急性排斥反应的影响。**方法:**构建特异性 C5L2 干扰腺病毒,通过小鼠尾静脉注射入小鼠急性肾移植排斥模型,检测其血肌酐,ELISA 检测 Th17 相关细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-17 以及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- γ 的变化,同时检测小鼠肾组织病理改变。**结果:**成功建立小鼠急性肾移植排斥模型,将构建的 C5L2 干扰腺病毒尾静脉注射后,小鼠血清 Cr 水平下降,IL-6、IL-17 以及 TNF- γ 水平下降,急性排斥反应减轻。**结论:**特异性 C5L2 干扰腺病毒可以抑制 Th17 细胞功能,减轻肾移植急性排斥反应。

【关键词】C5L2;肾移植急性排斥反应;Th17;腺病毒**【中图分类号】**R392.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-07

Influence of inhibiting C5L2 expression on Th17 function and kidney transplantation acute rejection reaction in mouse model

Cheng Honglin¹, He Yunfeng², Zhang Yao², Wang Delin², Pu Jun², Wu Xiaohou²

(1. Department of Urologic Surgery, the Changshou People's Hospital of Chongqing;

2. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the influence of inhibiting C5L2 expression on Th17 function and kidney transplantation acute rejection reaction in mouse model. **Methods:** The C5L2 interference adenovirus was constructed, and injected into kidney transplantation acute rejection reaction mouse model by tail vein. The change of serum creatinine (Cr) was detected. Th17 related cytokines interleukin (IL)-6, IL-17 and tumor necrosis factor (TNF)- γ were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Kidney pathological change was detected after 1 weeks. **Results:** C5L2 interference adenovirus was constructed and injected into kidney transplantation acute rejection reaction mouse model successfully. In experimental group, the levels of serum Cr decreased, IL-17, IL-6 and TNF- γ were decreased. **Conclusion:** C5L2 interference adenovirus can inhibit the function of Th17 cells, and can reduce the kidney transplantation acute rejection reaction in mouse model.

【Key words】C5L2; kidney transplantation acute rejection reaction; Th17; adenovirus

C5a 是补体裂解片段中显示过敏毒素作用最强的介质,分别为 C3a 和 C4a 作用的 20 倍和 2 500 倍。C5a 与其受体结合激发细胞脱颗粒,释放组胺等血

管活性物质,可以调节多种细胞表达细胞因子。作为 C5a 的主要受体之一,C5L2 在 C5a 介导的移植免疫调控中一定也发挥了重要的作用。因此,对 C5L2 在肾移植中的免疫调节机制的深入研究有十分重要的临床参考价值。本研究构建 C5L2 特异性干扰腺病毒,检测其 C5L2 表达下降后对 Th17 细胞功能及肾移植急性排斥反应的影响。

作者介绍:程洪林,Email:chenghonglin2006@126.com,

研究方向:泌尿系肿瘤、结石等。

通信作者:何云锋,Email:hyf028@163.com。

基金项目:教育部博士点新教师基金资助项目(编号:20115503120012);

重庆市教委基金资助项目(编号:KJ1500207)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180329.1655.032.html

(2018-03-30)

1 材料和方法

1.1 主要试剂

BALB/c (H2d)和 C57BL/6(H2b)小鼠购于重庆医科大学实验动物中心,T4 DNA ligase、T4 DNA Polymerase、*Sfi* I、*Eco*R V 购于 BD 公司,Cr、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-17、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- γ 、ELISA 检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司。pSES-HUS 质粒载体、BJ5183 以及人肾上皮细胞 293 逆转录病毒由美国芝加哥大学何通川教授惠赠。

1.2 小鼠肾移植急性排斥反应模型的建立

BALB/c (H2d)→C57BL/6(H2b)小鼠肾移植模型建立^[4],术前 7 d 先行 H2d 小鼠皮肤移植致敏受体。取 BALB/c (H2d)小鼠的左肾作为供肾,在左肾肾蒂的上方结扎并切断腹主动脉以及下腔静脉,在其下方取至左侧髂血管分叉处,完整取出左侧的输尿管以及膀胱。C57BL/6(H2b)小鼠作为受体,分离左侧输尿管并结扎、剪断,切除左侧肾脏,然后行肾脏移植手术。供肾的下腔静脉和受体肾的肾静脉行端端吻合,硬膜外导管穿过供肾腔静脉然后外翻腔静脉,将外翻后的腔静脉捆扎于导管上,利用导管支撑将外翻后的腔静脉插入受体肾静脉,将受体肾静脉捆扎于导管,完成静脉吻合;供体肾的腹主动脉与受体的腹主动脉行端侧吻合,缝合 3~4 针;输尿管带膀胱瓣吻合于受体膀胱。注意事项:①静脉吻合时采用套入式吻合,将肾静脉套扎在腔静脉时保持粘膜面的平整;②切除供肾时分支血管尽量电凝止血,减少线结,有利于吻合时视野清晰;③手术过程中尽量采用碎冰敷或者冰水纱布覆盖供肾;④吻合方式均为 180°,双定点连续端侧吻合;⑤保持血管壁外翻以防止血栓形成;⑥术后不使用免疫抑制剂,术后 5 d 切除右肾。

1.3 C5L2 干扰腺病毒构建

按照 GenBank 设计小鼠 C5L2 (NM_002308702)编码区的干扰序列 (19 bp),上游为 5'-GGAAGCGCUGGUCAUGU-GA-3',下游为 3'-GGGAGACGUGGUACUUAAGC-5',连接 *Sfi* I、*Eco*R V 酶切位点,然后在 DNA 聚合酶作用下形成双链序列;*Sfi* I 以及 *Eco*R V 双酶切线性化带有启动子的质粒的表达载体 pSES-HUS 在 T4 DNA 连接酶作用下,将双链模板以及线性化质粒连接成为环状质粒。将其转入到 BJ5183,然后转染 293 细胞。收集转染后的细胞加入 100 μ L 培养基,于 -80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 循环裂解细胞 4 次,离心并收集上清液。293 细胞被反复感染 4 次后得到高浓度的 pSES-HUS-ROR- γ t 干扰腺病毒。500 μ L 病毒液通过尾静脉注入到动物模型,与此同时设计与人类基因组无同源性的序列模板为阴性对照),空白对照组为生理盐水。

1.4 肾功能

取眼静脉血 30 μ L 后,根据 Cr 检测试剂盒的说明书,于第 0、3、6、9、12 天检测 Cr 变化。

1.5 IL-17、IL-6 和 TNF- γ

取眼静脉血 100 μ L,按照 IL-6、IL-17 以及 TNF- γ 检测试剂盒说明书,分别于第 0、3、6、9、12 天检测 Th17 相关细胞因子变化。

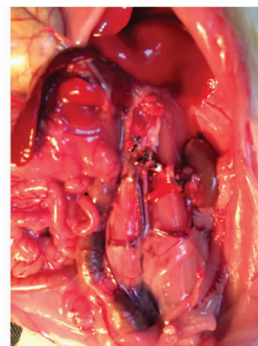
1.6 统计分析

采用 SAS 9.4 统计学软件进行统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,不同时间点计量资料比较采用重复测量方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 法。检验水准 $\alpha=0.05$,组间两两比较检验水准 $\alpha'=\alpha/m=0.0167$ 。

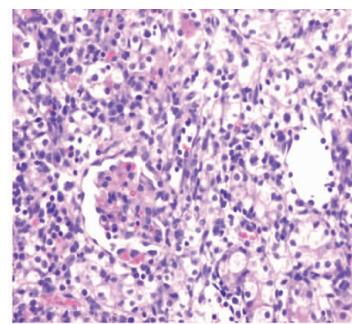
2 结果

2.1 小鼠肾移植急性排斥反应模型的建立

移植后动静脉通畅,血管充盈良好,手术后 (7.5 $\pm$ 1.2)d 移植肾发生排斥反。移植肾的病理检查提示间质血管炎症、出血以及水肿,肾小球以及肾小管坏死 (图 1),移植肾内 IgG、C3 以及 C5 广泛性沉积,单核细胞以及巨噬细胞明显浸润。外周循环监测提示 DSA (IgG、IgM) 明显升高^[4]。



A. 吻合后的动静脉及膀胱



B. 急性排斥反应

图 1 急性排斥肾移植模型建立

Fig.1 Kidney transplantation acute rejection reaction in mouse model

2.2 pSES-HUS-C5L2 干扰腺病毒构建成功

酶切鉴定表明成功构建 pSES-HUS-C5L2 质粒,质粒构建成功后 *Sfi* I 以及 *Eco*R V 可以酶切下 C5L2 片段,而 *Sfi* I 以 *Not* I 不能酶切 (图 2)。293 细胞被重组病毒成功感染后,可见红色荧光表达 (图 3)。

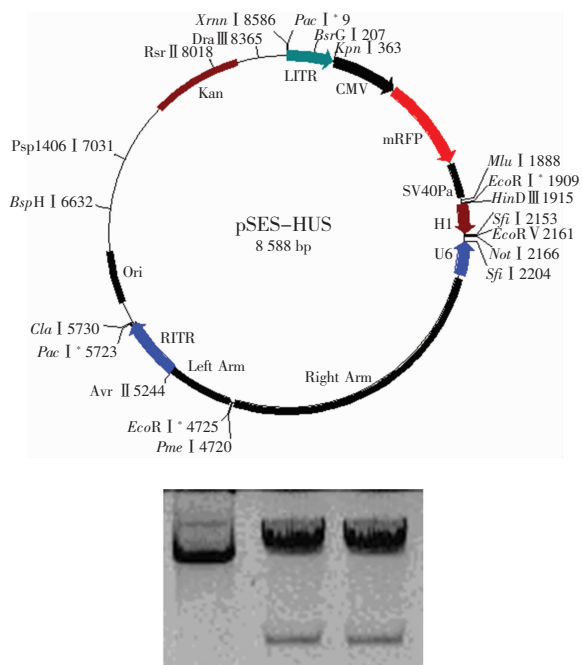


图 2 pSES-HUS 质粒图谱和酶切鉴定

Fig.2 Plasmid map and identification by restriction analysis of pSES-HUS plasmid

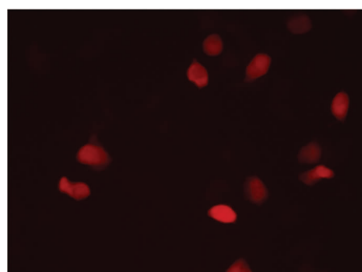


图 3 pSES-HUS- C5L2 干扰腺病毒感染 293 细胞

Fig.3 pSES-HUS- C5L2 adenovirus infect the 293 cells

2.3 肾功能动态改变

阴性对照组及空白对照组 Cr 水平逐渐升高,第 6 天达到排斥水平,实验组 Cr 水平逐渐升高,第 9 天达排斥水平,排斥时间晚于阴性对照组及空白对照组。将各组 Cr 水平进行比较,实验组、阴性对照组和空白对照组的 Cr 水平不全相同,差异具有统计学意义 ($F=8.900, P=0.004$);将实验组与阴性对照组和空白对照组的 Cr 水平分别进行比较,实验组的 Cr 水平均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ($F_{实-阴}=43.890, P_{实-阴}=0.000; F_{实-空}=9.900, P_{实-空}=0.014$)。见表 1。

2.4 IL-6、IL-17、TNF- γ 的动态变化

实验组中 IL-6、IL-17 和 TNF- γ 逐渐下降,第 9 天达到最低谷。将实验组与阴性对照组和空白对照组的 IL-6 水平分别进行比较,实验组的 IL-6 水平均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ($F_{实-阴}=10.180, P_{实-阴}=0.013; F_{实-空}=50.620, P_{实-空}=0.000$)。见表 2。将实验组与阴性对照组和空白对照组的 IL-17 水平分别进行比较,实验组的 IL-17 水平均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ($F_{实-阴}=25.100, P_{实-阴}=0.001; F_{实-空}=13.180, P_{实-空}=0.007$)。见表 3。将实验组与阴性对照组和空白对照组的 TNF- γ 水平分别进行比较,实验组的 TNF- γ 水平均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 ($F_{实-阴}=17.740, P_{实-阴}=0.003; F_{实-空}=22.200, P_{实-空}=0.002$)。见表 4。

2.5 肾脏组织病理检测改变

各组移植肾病病理检查提示间质血管炎症、出血以及水肿,肾小球以及肾小管坏死,移植肾内 IgG、C3、C5 广泛性沉积,单核细胞以及巨噬细胞明显浸润,其中实验组程度较轻 (图 4)。

表 1 各组血中 Cr 改变($\mu\text{mol/L}$)Tab.1 Change of creatinine in each group($\mu\text{mol/L}$)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天
实验组 ($n=5$)	37.2 ± 5.1	43.0 ± 6.5	65.2 ± 10.0	106.6 ± 7.7	117.4 ± 10.5^a
阴性对照组 ($n=5$)	36.8 ± 5.4	39.8 ± 5.8	96.4 ± 12.7	124.2 ± 10.6	133.6 ± 20.4
空白对照组 ($n=5$)	38.2 ± 8.4	41.6 ± 14.7	97.2 ± 12.5	127.2 ± 24.4	133.8 ± 26.5

注: $F_{组别}=8.900, P_{组别}=0.004; F_{时间}=137.510, P_{时间}=0.000; F_{组别 \times 时间}=1.690, P_{组别 \times 时间}=0.175$; a: 实验组与阴性对照组和空白对照组相比较, $P<0.016$; b: 该资料不满足球形对称性,采用 Greenhouse-Geisser (G-G) 法进行校正后得到 P

表 2 各组血中 IL-6 水平(pg/mL)Tab.2 Change of interleukin-6 in each group(pg/mL)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天
实验组 ($n=5$)	23.4 ± 2.4	22.0 ± 4.5	17.6 ± 3.9	15.8 ± 4.4	15.6 ± 4.7^a
阴性对照组 ($n=5$)	25.2 ± 2.9	24.6 ± 2.5	25.8 ± 4.3	24.4 ± 3.0	22.6 ± 3.4
空白对照组 ($n=5$)	27.6 ± 3.4	38.2 ± 3.1	39.4 ± 3.8	28.6 ± 5.6	29.2 ± 3.7

注: $F_{组别}=31.120, P_{组别}=0.000; F_{时间}=12.470, P_{时间}=0.000; F_{组别 \times 时间}=7.860, P_{组别 \times 时间}=0.000$; a: 实验组与阴性对照组和空白对照组相比较, $P<0.016$; b: 该资料不满足球形对称性,采用 Greenhouse-Geisser (G-G) 法进行校正后得到 P

表 3 各组血的 IL-17 水平(pg/mL)
Tab.3 Change of interleukin-17 in each group(pg/mL)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天
实验组 (n=5)	12.4 ± 2.6	10.6 ± 1.8	10.4 ± 1.7	7.8 ± 3.0	8.4 ± 2.3 ^a
阴性对照组 (n=5)	12.6 ± 2.9	13.8 ± 1.5	11.6 ± 2.2	13.2 ± 2.6	12.8 ± 1.6
空白对照组 (n=5)	13.2 ± 3.0	12.6 ± 3.4	13.6 ± 1.7	13.8 ± 1.8	13.4 ± 2.0

注: $F_{\text{组别}} = 10.180, P_{\text{组别}} = 0.003; F_{\text{时间}}^b = 0.810, P_{\text{时间}} = 0.451; F_{\text{组别} \times \text{时间}}^b = 1.820, P_{\text{组别} \times \text{时间}} = 0.161$; a: 实验组与阴性对照组和空白对照组相比较, $P < 0.016$; b: 该资料不满足球形对称性, 采用 Greenhouse-Geisser (G-G) 法进行校正后得到 P

表 4 各组血中 TNF- γ 水平(pg/mL)
Tab.4 Change of TNF- γ in each group(pg/mL)

组别	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天
实验组 (n=5)	24.6 ± 4.5	19.4 ± 3.7	12.4 ± 3.4	9.8 ± 3.3	8.8 ± 2.6 ^a
阴性对照组 (n=5)	23.2 ± 3.7	23.4 ± 3.4	26.0 ± 8.3	24.6 ± 3.8	21.6 ± 4.8
空白对照组 (n=5)	23.6 ± 5.4	22.8 ± 4.4	24.6 ± 2.3	22.0 ± 4.1	22.6 ± 3.9

注: $F_{\text{组别}} = 12.850, P_{\text{组别}} = 0.001; F_{\text{时间}}^b = 7.730, P_{\text{时间}} = 0.003; F_{\text{组别} \times \text{时间}}^b = 6.870, P_{\text{组别} \times \text{时间}} = 0.001$; a: 实验组与阴性对照组和空白对照组相比较, $P < 0.016$; b: 该资料不满足球形对称性, 采用 Greenhouse-Geisser (G-G) 法进行校正后得到 P

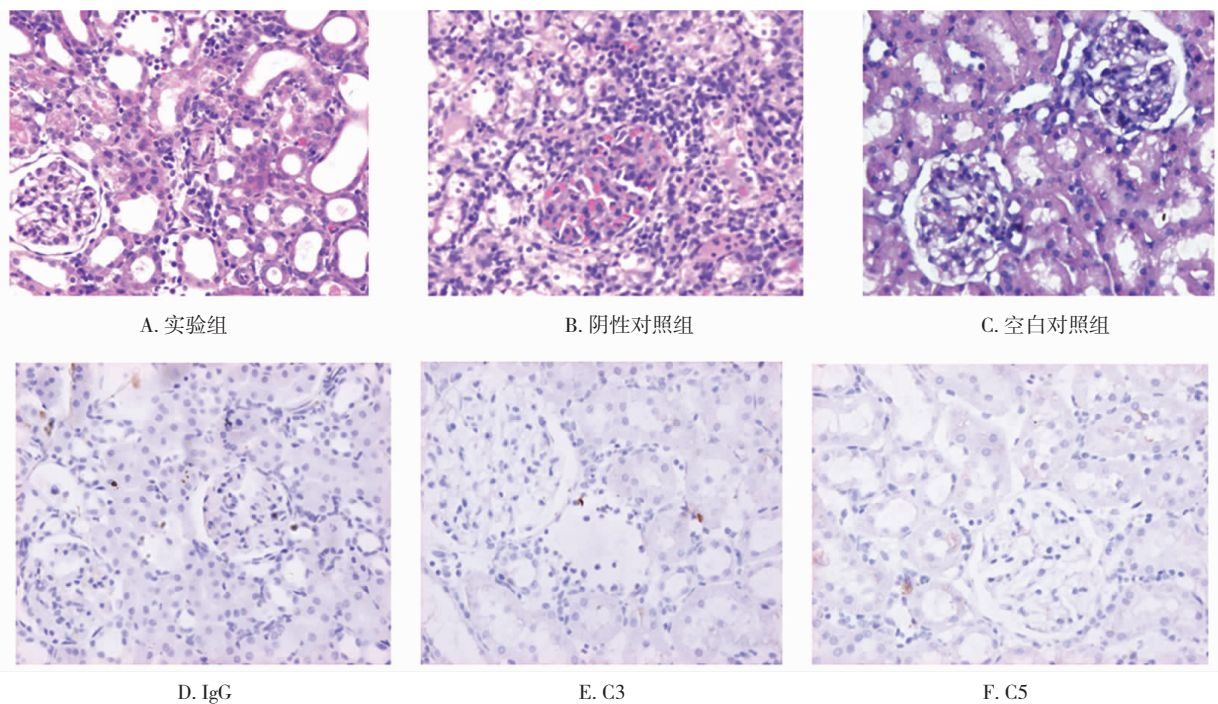


图 4 各组移植肾病理改变
Fig.4 Graft pathological changes in each group

3 讨论

在肾移植急性排斥反应中,供者抗原首先通过 DC 细胞的迁移、成熟,然后在受者的次级淋巴系统中将供者抗原提呈给受者,激活受者的免疫系统,导致相关的免疫应答和免疫排斥反应的发生。其中

C5a 是补体裂解片段中显示过敏毒素作用最强的介质,分别为 C3a 和 C4a 作用的 20 倍和 2 500 倍。C5L2 是 C5a 的主要受体之一^[2-4],其在肾移植急性排斥反应中的作用如何,备受关注 and 值得研究。

本研究首先成功建立小鼠急性排斥反应模型,在硬膜外导管的支撑下,供肾的下腔静脉与受体肾静脉作端端吻合,硬膜外导管穿过供肾腔静脉然后

外翻,将外翻后的腔静脉捆扎于导管上,利用导管支撑将外翻后的腔静脉插入受体肾静脉,将受体肾静脉捆扎于导管,完成静脉吻合;供体肾的腹主动脉和受体腹主动脉行端侧吻合;输尿管带膀胱瓣吻合于受体膀胱。此模型的特点是降低了静脉吻合的难度,对静脉采用“套扎”式吻合,节省时间,效果确切。在此基础上,通过尾静脉向模型鼠内注入成功构建的 pSES-HUS-C5L2 干扰腺病毒,这种腺病毒可以稳定干扰 C5L2,当其注入到肾移植模型内,可特异性干扰 C5L2 的表达,达到基因沉默的效果。和以往的干扰质粒比较,这种干扰腺病毒作用更稳定,转染时不需特殊的辅助试剂,而且在细胞内可以稳定表达。

pSES-HUS-C5L2 干扰腺病毒被注入后,病理结果发现实验组急性排斥反应程度减轻,到达急排高峰时间延长;同时导致 Th17 相关的细胞因子 IL-6、IL-17 以及 TNF- γ 水平明显下降,第 9 天下降到最低。因此,C5L2 干扰腺病毒在模型体内可以成功转染,而且能特异性干扰 Th17 细胞分泌相关的细胞因子,而 Th17 细胞发挥作用的关键就是依靠这些细胞因子^[5],当抑制 Th17 细胞分泌相关细胞因子的功能后,可部分缓解肾移植急性排斥反应。其作用机制可能与 C5L2 表达抑制后,C5a 不能与其受体结合,从而其下游相关活动均受到抑制有关,包括不能激发细胞脱颗粒;不能释放组胺等血管活性物质;不能通过 C5a 途径调节多种细胞表达细胞因子,包括 IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF- α 等细胞因子^[6-7];不能促进抗原及同种异体抗原诱导的 T 细胞增殖及 B 细胞产生抗体等^[8];C5a 对中性粒细胞、嗜酸粒细胞和单核细胞的趋化作用明显减弱。已有研究证实 C5L2 与 C5aR 共同竞争 C5a 从而抑制 C5a 的炎症作用,但近期研究发现在败血症模型中,C5L2 可以促进释放大鼠高迁移率族蛋白 B1,增强 C5a 介导的炎症病理改变^[9-10]。另一项对急性肺损伤模型的研究发现,肺组织模型中局部表达 C5L2 后,可以介导 C5a 导致的急性肺损伤炎症反应。这 2 个研究从另一个角度证实了 C5L2 作为 C5a 受体在炎症介导中的重要作用。

研究表明 Th17 能够分泌产生 IL-6、IL-17 以及

TNF- γ 等多种细胞因子,而这些细胞因子可参与 CD4⁺ 淋巴细胞等的分化诱导,参与介导炎症反应,是细胞间信号传导分子^[5]。而炎症反应炎症细胞,如淋巴细胞以及单核巨噬细胞等的局部浸润,与移植肾排斥及功能丧失密切相关。曾有报道在胰腺移植中先行 C5a 抗体阻断,明显减轻了移植排斥反应的发生,并认为这是通阻断了补体间的相互作用引起,而不是单纯抑制了 C5a 介导的炎症,因此其具体作用机制还值得深入讨论和研究^[11]。

参 考 文 献

- [1] 赵大强,孙启全. 抗体介导的小鼠肾移植急性排斥反应动物模型[J]. 器官移植,2015,6(4):222-223,244.
- [2] Wang R, Lu B, Gerard C, et al. C5L2, the second C5a anaphylatoxin receptor, suppresses LPS-induced acute lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 55(5):657-666.
- [3] Poursharifi P, Lapointe M, Fisette A, et al. C5aR and C5L2 act in concert to balance immunometabolism in adipose tissue[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(1):325-333.
- [4] Zheng YY, Xie X, Ma YT, et al. Association of C5L2 genetic polymorphisms with coronary artery disease in a Han population in Xinjiang, China[J]. Oncotarget, 2017, 8(5):8590-8596.
- [5] Sullivan JA, Adams AB, Burlingham WJ. The emerging role of TH17 cells in organ transplantation[J]. Transplantation, 2014, 97(5):483-489.
- [6] Gauvreau D, Gupta A, Fisette A, et al. Deficiency of C5L2 increases macrophage infiltration and alters adipose tissue function in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e60795.
- [7] Bosmann M, Haggadone MD, Zetoune FS, et al. The interaction between C5a and both C5aR and C5L2 receptors is required for production of G-CSF during acute inflammation[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(7):1907-1913.
- [8] Li R, Coulthard LG, Wu MC, et al. C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a[J]. FASEB J, 2013, 27(3):855-864.
- [9] Fonseca MI, McGuire SO, Counts SE, et al. Complement activation fragment C5a receptors, CD88 and C5L2, are associated with neurofibrillary pathology[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10:25.
- [10] Li R, Coulthard LG, Wu MC, et al. C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a[J]. FASEB J, 27(3):855-864.
- [11] Nakanishi W, Goto M, Inagaki A, et al. A precise analysis of C5a inhibitory peptide on inflammatory mediators induced after islet transplantation[J]. Transplant Proc, 2011, 43(9):3235-3238.

(责任编辑:冉明会)